

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891027

研究課題名(和文)非対称な遺伝子発現パターンを生むメカニズムの構成的アプローチによる解明

研究課題名(英文) Investigation of a mechanism to form an asymmetric gene expression pattern by a reconstitutive approach

研究代表者

関根 亮二 (Sekine, Ryoji)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：70730232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、初期発生で重要な遺伝子発現パターンの非対称化がNodal-Leftyシグナル系のみで可能なのか、そのパターンの形成に重要な要素は何なのかという疑問をもった。本研究は、Nodal-Lefty系を培養細胞内へ再構成し、非対称パターン形成が再現できるかどうかの検証を通じて、その疑問に答えることを目的としている。

申請者は、人工Nodal-Lefty系を培養細胞(HEK293細胞)に導入し、小さな高Nodal発現領域の自律的な形成を確認し、さらにNodal伝播の亢進によりより大きな発現領域の形成を実現した。さらに、Lefty2による抑制力の向上によるさらなるパターンの改善の糸口もつかんだ。

研究成果の概要(英文)：In animal development, spatial patterns of gene expression determine how body parts, such as limbs, form their shapes at correct positions. Asymmetric gene expression pattern formation by Nodal-Lefty signaling is one of the most important processes in early developmental stages. However, no one has shown the pattern formation in live cells yet. In this study, we are trying to answer whether an asymmetric pattern can be realized in cultured cells only by the Nodal-Lefty signaling system, and what is the most important component to control the pattern.

We engineered a synthetic Nodal-Lefty signaling system in cultured cells (HEK293 cells), and found that they automatically formed small high/low Nodal expression regions. Furthermore, we realized larger regions by the enhancement of the Nodal propagation. We also found how to enhance the inhibition activity of Lefty2 which would improve the pattern.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成製生物学 発生生物学 Nodal

### 1. 研究開始当初の背景

発生初期の胚では、それまで対称であった遺伝子発現の空間パターンが非対称になるという現象が起こる。この現象には BMP, ヘッジホッグをはじめとした様々なシグナル分子やノード流が関わっているが、その中でも Nodal と Lefty という活性化因子、抑制因子の関係にある拡散性のシグナル分子は重要な役割を果たしていると考えられる。また、Nodal-Lefty シグナル系は Lefty の拡散速度が Nodal の拡散速度よりもはるかに大きいという事実は、数理的な観点で見ると、Turing pattern 形成の必要条件を満たしているように見える。

このように、Nodal-Lefty 系による遺伝子発現の空間パターン形成は、発生学、数理生物学両方の観点から興味深い対象である。しかしながら、Nodal-Lefty シグナル系がそれ自身でパターン形成を起こせることを生細胞で実際に確認した例は今のところ報告されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子発現の非対称パターン形成が Nodal-Lefty 系のみで可能なのか、そのパターンの大きさや形に重要なパラメータは何なのかという疑問に取り組む。

### 3. 研究の方法

本研究は2つのサブテーマで構成される。

(1) Nodal-Lefty 系を培養細胞(HEK293AD)内に遺伝子回路(図1)で再構成し、非対称なパターンの形成が再現できるかどうかを明らかにする。

(2) Nodal-Lefty 系のパラメータ操作によるパターンの数・形・大きさの変化を観測し、非対称パターン形成に重要なパラメータを明らかにする。ここでパラメータとは、Nodal に対する各遺伝子の転写活性の感度や、Nodal, Lefty の拡散係数などを指す。

本研究は、注目する要素のみを細胞に実装させる遺伝子回路で構築したモデルシステムの操作および観測を通じて、仮説検証を行っていくものである。

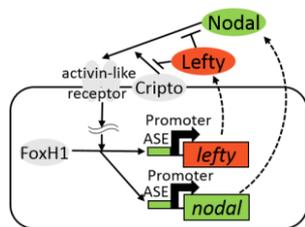


図1 Nodal-Lefty 系を再構成する遺伝子回路

### 4. 研究成果

#### (1) Nodal-Lefty 系の再構成およびパターン形成の再現

本研究では、まず Nodal 応答プロモーターの下流に luciferase を繋いだ  $P_{Nodal}$ -luc を使

って Nodal と Lefty に対するシグナル応答曲線を得た(図2左)。そして、このシグナル応答曲線を元にして、Nodal-Lefty シグナル系のシミュレーションを行ったところ、この Nodal-Lefty 系が Turing pattern 様の周期的なパターンを引き起こしうることを確認した(図2右)。

次に、細胞から発現される Nodal や Lefty が二次元培養条件で十分に機能を持つかどうかを確認した。本実験では、Nodal または Lefty を恒常発現する細胞のコロニーをあらかじめ作っておき、そこにリポーター細胞を撒き、そのリポーター活性を顕微鏡観察するものである。以上の実験の結果、Nodal 発現細胞の周りでのリポーター活性の活性化および、Lefty2 発現細胞の周りでのリポーター活性の抑制が観測できた(図3)。

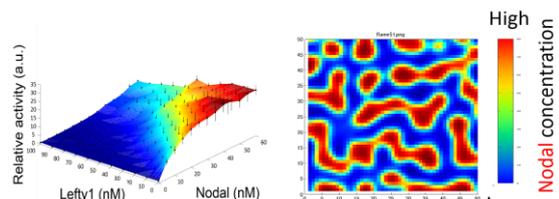


図2 シグナル応答曲線とシミュレーション

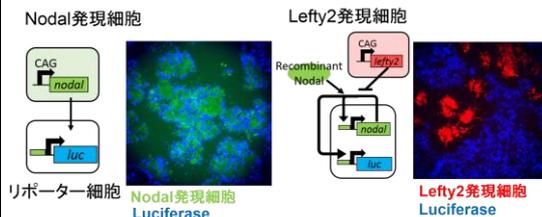


図3 Nodal, Lefty の機能確認実験

続いて、完成版の合成 Nodal-Lefty シグナル系を作製し、この系を導入した細胞のパターン形成の様子を観察した(図4)。コントロールの Nodal 自己活性化細胞(図4左)では、luciferase リポーター活性が視野全体で活性化しているのに対して、完成版の合成 Nodal-Lefty シグナル系を導入した細胞では、高活性、低活性の領域ができた(図4右)。ところで、図4の実験では、パターン形成のトリガーとして低濃度のリコンビナント Nodal の添加を必要とする。私たちはトリガ

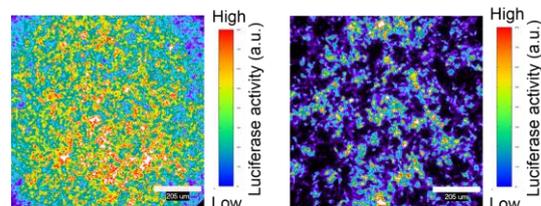


図4 合成 Nodal-Lefty シグナル系によるパターン形成

一無しにパターン形成を開始できるほど Nodal の発現量が高くなれば、より大きく綺麗なパターンができるのではないかと考えた。

そこで本研究では次に、 $P_{Nodal}$ -GFP を細胞に

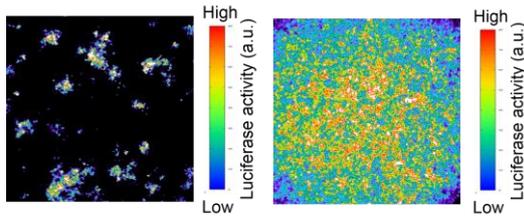


図5 トリガー非添加条件下での自己活性化の様子。(左) 図4左の自己活性化細胞。(右) 強自己活性化クローン。

導入することで、FACS で Nodal 高発現クローンの取得をしやすくする仕組みを作った。その結果、トリガー非添加条件下で Nodal の自己活性化を起こせる強自己活性化クローンを取得できた。(図5右)。

続けて、私たちは強自己活性化クローンに  $P_{Nodal}$ -Lefty2 を導入して、完成版の合成 Nodal-Lefty シグナル系細胞を作製した。ところが、この細胞は Lefty2 を導入しているにもかかわらず、元の自己活性化クローンと同様に luciferase リポーター活性が視野全体で活性化してしまった。これは、Nodal 発現が強すぎて Lefty2 で抑えられない程であったことが原因だと考えられる。

上記の Lefty2 発現細胞のコンディションドメディウムを、Lefty 抗体でウェスタンブロット解析したところ、ほとんどが未成熟型であった(図6)。先行研究(R. Sakuma, *et al.*, *Genes to Cells*, 2002)において、subtilisin-like proprotein convertase (SPC) によって Lefty2 が成熟型になることで Lefty2 が活性を得ることが報告されている。そこで本研究では、SPC の一種であるタンパク質 Furin で Lefty2 の成熟型の比率を上げ、効率よく Nodal を抑える方針を取ることとした。予備実験として、Lefty2 発現細胞に Furin 発現プラスミドを導入したところ、コンディションドメディウム内の成熟型 Lefty2 の比率が大幅に高くなった(図6)。

今後は、Furin を導入した Lefty2 発現細胞で図3の実験を行い、私たちの実験系においても Furin で Lefty2 の Nodal シグナル抑制効果が向上することを確認する。そして、上記の完成版 Nodal-Lefty シグナル系細胞に Furin を導入した細胞を作製し、パターン形成を観察する予定である。



図6 Lefty 抗体によるウェスタンブロット

## (2) Nodal-Lefty 系のパラメータ操作

シミュレーションによると、Nodal や Lefty2 の拡散速度を操作すると、パターンが大きく変わることが予想される。拡散速度の操作の前に、拡散速度の測定の実験系をたてることが先決である。

分泌された Nodal や Lefty2 は培地中に拡散していくとすると、ディッシュ内の細胞に均一に効くと考えられる。ところが、図3を見ると、Sender 細胞から分泌された Nodal や Lefty2 はディッシュ内の細胞均一に効くというよりは、Sender 細胞に隣接する細胞に特に効いているように見える。私たちは、Nodal や Lefty2 が細胞間隙を通っているのではないかと考え、まずは、v5 タグを付与した Nodal (v5Nodal) の分布を免疫染色で調べることにした。本実験では、v5Nodal 発現細胞のコロニーをあらかじめ作製した後、 $P_{Nodal}$ -d1mCherryNLS (核内移行シグナルおよび分解タグ付きの mCherry) をリポーター細胞として撒いた。なお、本実験では細胞表面に付着した Nodal に興味があるので、透過処理を行わずに染色を行った。その結果、細胞間隙とディッシュ面に近い部分に多く v5Nodal が存在することが分かった(図7)。また、この視野に関して言えば、底面にある v5Nodal の濃さと mCherry リポーター活性に関係がありそうだが、あくまでプレリミナリーなデータなので、結論づけるには更なる追試が必要である。

今後は、底面 v5Nodal 濃度とリポーター活性とに関係があるのかどうかを精査する。その際、Sender 細胞からの距離を定量化しやすくするために、Sender 細胞のコロニーとリポーター細胞のコロニーとの境界が直線になるように工夫すべきである。また、v5 タグを付与した Lefty2 についても同様の実験を行う。そして、Nodal と Lefty2 の拡散様式や拡散距離の違いを調べる予定である。

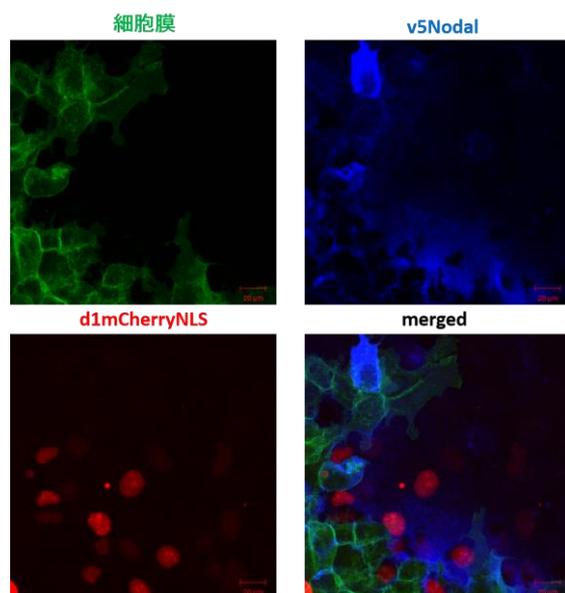


図7 v5Nodal の免疫染色。スケールバーは 20  $\mu$  m.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 件)

[学会発表] (計 3 件)

① Ryoji Sekine, Mitsuhiro Matsuda, Miki Ebisuya, “Synthetic Turing pattern formation using the Nodal-Lefty signaling system in cultured cells,” 26th CDB meeting, 大阪大学, 大阪府吹田市, 2015年11月12日～13日 (ポスター発表)

② Ryoji Sekine, Mitsuhiro Matsuda, Miki Ebisuya, “Synthetic Turing pattern formation using the Nodal-Lefty signaling system in cultured cells,” 26th CDB meeting, 理化学研究所多細胞システム形成研究センター, 兵庫県神戸市, 2015年9月8日～9日 (ポスター発表)

③ 関根亮二, 松田充弘, 戎家美紀, “Nodal-Lefty シグナル系で Turing pattern を作る,” 生命動態の分子メカニズムと数理～生命動態システム科四拠点・CREST・PRESTO 合同シンポジウム, 京都大学, 京都府京都市, 2015年3月16日～17日 (ポスター発表)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 亮二 (SEKINE, Ryoji)

理化学研究所・生命システム研究センタ

ー・基礎科学特別研究員

研究者番号: 70730232

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: